

**DEMONSTRASI KEHADIRAN PROTEIN PERMUKAAN SEL YANG
ANTIGENIK DAN SPESIFIK UNTUK *Shigella* spp. DAN PEMBANGUNAN KE
ARAH UJIAN DIAGNOSTIK SEGERA BAGI PENYAKIT SHIGELOSIS**

Oleh

KIRNPAL KAUR A/P BANGA SINGH

**Tesis yang diserahkan untuk memenuhi
keperluan bagi Ijazah Sarjana Sains**

SEKOLAH

Januari 2001

PENGHARGAAN

Saya mengucapkan setinggi-tinggi penghargaan kepada penyelia utama saya, Dr. Mohd. Zaki Salleh di atas segala tunjuk ajar, galakan, bimbingan dan nasihat selama tempoh perlaksanaan kajian dan penulisan tesis ini. Ucapan terima kasih juga ditujukan kepada Prof. Dr. Asma Ismail, selaku penyelia bersama yang banyak memberikan panduan, tunjuk ajar dan kritikan konstruktif di sepanjang kajian dan penulisan tesis ini.

Ribuan terima kasih juga ditujukan kepada Prof. Madya Dr. Zainul F. Zainuddin di atas segala kemudahan dan bantuan yang diberikan di sepanjang melaksanakan kajian dan penulisan tesis ini. Ucapan terima kasih juga ditujukan kepada semua staf di Makmal Diagnostik Serologi dan Makmal Penyelidikan Biologi Molekul di Jabatan Mikrobiologi khasnya Puan Sabariah Osman dan Puan Rosliza. Penghargaan ini juga ditujukan kepada semua kakitangan Makmal Penyelidikan iaitu En. Zainoodin, Kak Pah, Zahera, Nasir, Ridhwan, Robaiza, Kak Za, Kak Gee, La, Liza, Shikin, Suharni, Anis, Wana, Kak Tie dan semua staf MBDr yang lain.

Ucapan jutaan terima kasih juga ditujukan kepada Lau Hut Yee di atas segala tunjuk ajar, nasihat, galakan dan semangat sepanjang tempoh menjalankan kajian ini. Saya juga menghargai ibu dan keluarga saya yang telah banyak memberikan sokongan sepanjang tempoh kajian ini.

	penyusun, pH 6.8	
	2.6.2.2 Kaedah penyediaan gel penyusun 4.5%	42
2.6.3	Penyediaan larutan penampan elektroforesis	43
2.6.4	Penyediaan larutan penampan sampel	43
2.6.5	Penyediaan pewarna Coomassie blue	44
2.6.6	Penyediaan larutan akues nyahwarna (destainer)	44
2.6.7	Kaedah elektroforesis	44
2.7	Imunoasai Blot Western	45
	2.7.1 Penyediaan larutan penampan pemindah (dengan SDS)	47
	2.7.2 Penyediaan larutan penampan pemindah (tanpa SDS)	47
	2.7.3 Penyediaan larutan Ponceau S	47
	2.7.4 Penyediaan larutan 3% susu tanpa lemak	48
	2.7.5 Penyediaan larutan 1 M NETG	48
	2.7.6 Penyediaan antibodi primer	48
	2.7.7 Penyediaan antibodi sekunder (dikonjugat dengan AP)	48
	2.7.8 Penyediaan larutan substrat alkalin fosfatase (kit daripada Bio-Rad, USA)	49
2.8	Elektroelusi protein	49
	2.8.1 Penyediaan larutan penampan elusi	50
2.9	Penulenan serum shigelosis untuk mendapatkan anti-35 kDa poliklon	51
	2.9.1 Penyediaan pewarna Coomassie blue untuk PVDF	52
	2.9.2 Penyediaan larutan 0.15 M NETG	52
	2.9.3 Penyediaan larutan TBS-Tween 20 (0.05%)	52
	2.9.4 Penyediaan larutan 0.15 M natrium klorida	53
	2.9.5 Penyediaan larutan 1 M dwikalium hidrogen fosfat (K_2HPO_4)	53
2.10	Asai imunoenzim titik (titik-EIA) ke atas serum dan tinja pesakit	53
2.11	Pewarnaan Asid Periodik Schiff's (PAS)	54
	2.11.1 Penyediaan 1% (v/v) asid periodik	55
	2.11.2 Penyediaan reagen Schiff's	55
2.12	Ujian pencernaan dengan enzim tripsin	55

BAB TIGA : KAJIAN UNTUK MENGENALPASTI KEHADIRAN PROTEIN PERMUKAAN YANG ANTIGENIK DAN SPESIFIK BAGI *Shigella* spp.

3.1	Pengenalan	58
3.2	Bahan dan kaedah penyelidikan	60

3.2.1	Organisma ujian	60
3.2.2	Spesimen	60
3.2.2.1	Serum (antibodi primer)	60
3.2.2.2	Spesimen tinja (antibodi primer)	62
3.2.2.3	Antibodi sekunder	62
3.2.3	Penyediaan protein permukaan	64
3.2.4	Elektroforesis Gel Natrium Dodesil Sulfat-Poliakrilamida (SDS-PAGE)	65
3.2.5	Imunoasai Blot Western	66
3.2.5.1	Tindakbalas serum jangkitan <i>Shigella flexneri</i> berbanding dengan serum jangkitan lain terhadap protein permukaan <i>Shigella flexneri</i> strain SF480	66
3.2.5.2	Tindakbalas serum jangkitan <i>Shigella flexneri</i> berbanding dengan serum normal manusia terhadap protein permukaan <i>Shigella flexneri</i> strain SF480	67
3.2.5.3	Tindakbalas ampaijan tinja jangkitan <i>Shigella flexneri</i> berbanding dengan ampaijan tinja jangkitan lain (yang patogen penyebabnya diketahui) terhadap protein permukaan <i>Shigella flexneri</i> strain SF480	68
3.2.5.4	Tindakbalas IgA ampaijan tinja jangkitan <i>Shigella flexneri</i> berbanding dengan ampaijan tinja diareja yang dihantar ke makmal diagnostik terhadap protein permukaan <i>Shigella flexneri</i> strain SF480	68
3.2.6	Penentuan kehadiran protein 35 kDa pada spesis <i>Shigella</i> yang lain	69
3.3	Keputusan	71
3.3.1	Penentuan masa optimum untuk penyediaan ekstrak protein permukaan <i>Shigella</i>	71
3.3.2	Profil protein permukaan beberapa strain <i>Shigella flexneri</i> dengan menggunakan teknik SDS-PAGE	73
3.3.3	Penentuan protein permukaan <i>Shigella flexneri</i> yang antigenik dan spesifik dengan menggunakan kaedah imunoasai blot Western	75
3.3.3.1	Tindakbalas serum jangkitan <i>Shigella flexneri</i> berbanding dengan serum jangkitan lain terhadap protein permukaan <i>Shigella flexneri</i> strain SF480	75
3.3.3.2	Tindakbalas serum jangkitan <i>Shigella flexneri</i> berbanding dengan serum normal manusia terhadap protein permukaan <i>Shigella flexneri</i> strain SF480	81
3.3.3.3	Tindakbalas ampaijan tinja jangkitan <i>Shigella flexneri</i> berbanding dengan ampaijan tinja jangkitan lain (yang patogen penyebabnya diketahui) terhadap protein permukaan <i>Shigella flexneri</i> strain SF480	86
3.3.3.4	Tindakbalas antibodi IgA daripada ampaijan tinja	90

jangkitan *Shigella flexneri* berbanding dengan ampaian tinja diarea yang dihantar ke makmal diagnostik terhadap protein permukaan *Shigella flexneri* strain SF480

3.3.4	Penentuan kehadiran protein 35 kDa pada spesis <i>Shigella</i> yang lain	93
-------	--	----

BAB EMPAT : PENCIRIAN PROTEIN 35 kDa

4.1	Pengenalan	97
4.2	Bahan dan kaedah penyelidikan	98
4.2.1	Organisma ujian	98
4.2.2	Elektroelusi protein 35 kDa	98
4.2.3	Penentuan lokasi protein 35 kDa	98
4.2.4	Ujian tindakbalas serum komersial polivalen <i>Shigella</i> spp. (Murex Biotech. Ltd., UK) terhadap protein permukaan <i>Shigella flexneri</i> strain SF480	99
4.2.5	Ujian pencernaan protein 35 kDa dengan enzim tripsin	100
4.2.6	Pewarnaan asid periodik Schiff's (PAS)	101
4.3	Keputusan	102
4.3.1	Penentuan lokasi protein 35 kDa	102
4.3.2	Tindakbalas serum komersial polivalen <i>Shigella</i> spp. (Murex Biotech. Ltd., UK) terhadap protein permukaan <i>Shigella flexneri</i> strain SF480	104
4.3.3	Ujian pencernaan protein 35 kDa dengan enzim tripsin	107
4.3.4	Pewarnaan asid periodik Schiff's (PAS)	109

BAB LIMA : PENGGUNAAN PROTEIN 35 kDa KE ARAH PEMBANGUNAN UJIAN DIAGNOSTIK SEGERA TITIK-EIA BAGI MENGESAN JANGKITAN *Shigella* spp.

5.1	Pengenalan	111
5.2	Bahan dan kaedah penyelidikan	114
5.2.1	Organisma ujian	114
5.2.2	Spesimen tinja	114
5.2.3	Penyediaan elusi protein 35 kDa	114
5.2.4	Penentuan kehadiran antibodi IgA di dalam ampaian tinja jangkitan <i>Shigella flexneri</i> , tinja diarea jangkitan patogen lain dan tinja subjek normal	116
5.2.5	Penentuan kepekatan optimum protein 35 kDa dan protein permukaan <i>Shigella flexneri</i> SF480 untuk ujian titik-EIA	117
5.2.6	Penentuan pencairan optimum ampaian tinja (antibodi primer) untuk ujian titik-EIA	118
5.2.7	Tindakbalas ujian titik-EIA ke atas beberapa spesimen	119

	tinja diarea jangkitan patogen lain yang diketahui penyebabnya	
5.2.8	Tindakbalas ujian titik-EIA ke atas beberapa spesimen tinja diarea yang dihantar ke makmal diagnostik	120
5.3	Keputusan	121
5.3.1	Penentuan kehadiran antibodi IgA di dalam ampaiian tinja jangkitan <i>Shigella flexneri</i> , tinja diarea jangkitan patogen lain dan tinja subjek normal	121
5.3.2	Penentuan kepekatan optimum protein 35 kDa dan protein permukaan <i>Shigella flexneri</i> SF480 untuk ujian titik-EIA	124
5.3.3	Penentuan pencairan optimum ampaiian tinja (antibodi primer) untuk ujian titik-EIA	127
5.3.4	Tindakbalas ujian titik-EIA ke atas beberapa spesimen tinja diarea jangkitan patogen lain yang diketahui penyebabnya	130
5.3.5	Tindakbalas ujian titik-EIA ke atas beberapa spesimen tinja diarea yang dihantar ke makmal diagnostik	133
BAB ENAM : PERBINCANGAN DAN KESIMPULAN		140
RUJUKAN		154
PEMBENTANGAN KERTAS KERJA		165

SENARAI JADUAL

Jadual	Muka surat
2.1 Spesis <i>Shigella</i> yang digunakan	34
3.1 Spesimen serum yang digunakan dalam kajian ini	61
3.2 Spesimen tinja yang digunakan dalam kajian ini	63
3.3 Ringkasan tindakbalas serum jangkitan <i>Shigella flexneri</i> dan serum jangkitan lain terhadap protein permukaan <i>Shigella flexneri</i> strain SF480	79
3.4 Ringkasan jalur antigenik yang bertindakbalas dengan serum jangkitan <i>Shigella flexneri</i> tetapi tidak dengan serum jangkitan lain yang diuji	80
3.5 Ringkasan tindakbalas serum jangkitan <i>Shigella flexneri</i> berbanding dengan serum normal manusia terhadap protein permukaan <i>Shigella flexneri</i> strain SF480	85
3.6 Ringkasan kehadiran jalur protein 35 kDa apabila ditindakbalaskan dengan serum dan ampai tinja jangkitan <i>Shigella flexneri</i> serta tinja jangkitan lain (yang diketahui patogen penyebabnya)	89
3.7 Tindakbalas IgA ampai tinja jangkitan <i>Shigella flexneri</i> berbanding dengan ampai tinja diarea yang dihantar ke makmal diagnostik terhadap protein permukaan <i>Shigella flexneri</i> strain SF480	92
3.8 Kehadiran protein 35 kDa pada spesis <i>Shigella</i> lain yang dikaji	96
4.1 Ringkasan jalur protein antigenik yang bertindakbalas dengan serum komersial polivalen <i>Shigella</i> spp. (Murex Biotech. Ltd., UK) terhadap protein permukaan <i>Shigella flexneri</i> strain SF480	106
5.1 Spesimen tinja yang digunakan dalam kajian ini	115
5.2 Interpretasi keputusan penentuan kehadiran antibodi IgA di dalam ampai tinja jangkitan <i>Shigella flexneri</i> , tinja diarea jangkitan patogen lain dan tinja subjek normal	123
5.3 Interpretasi keputusan ujian titik-EIA ke atas beberapa spesimen tinja diarea jangkitan patogen lain yang diketahui penyebabnya	132
5.4 Interpretasi keputusan ujian titik-EIA ke atas beberapa spesimen tinja diarea yang dihantar ke makmal diagnostik	137
5.5 Penentuan sensitiviti dan spesifiti ujian titik-EIA	139

SENARAI RAJAH

Rajah	Muka surat
3.1 Penentuan masa optimum untuk penyediaan ekstrak protein permukaan <i>Shigella flexneri</i> SF480	72
3.2 Profil SDS-PAGE protein permukaan <i>Shigella flexneri</i> yang diwarnakan dengan pewarna Coomassie blue	74
3.3 Tindakbalas serum jangkitan <i>Shigella flexneri</i> berbanding dengan serum jangkitan lain terhadap protein permukaan <i>Shigella flexneri</i> strain SF480	78
3.4 Tindakbalas serum jangkitan <i>Shigella flexneri</i> berbanding dengan serum normal manusia terhadap protein permukaan <i>Shigella flexneri</i> strain SF480	84
3.5 Tindakbalas ampaian tinja jangkitan <i>Shigella flexneri</i> berbanding dengan ampaian tinja jangkitan lain terhadap protein permukaan <i>Shigella flexneri</i> strain SF480	88
3.6 Tindakbalas IgA ampaian tinja jangkitan <i>Shigella flexneri</i> berbanding dengan ampaian tinja diareja yang dihantar ke makmal diagnostik terhadap protein permukaan <i>Shigella flexneri</i> strain SF480	91
3.7 Penentuan kehadiran protein 35 kDa pada spesis <i>Shigella</i> yang lain	95
4.1 Penentuan lokasi protein 35 kDa	103
4.2 Tindakbalas serum polivalen <i>Shigella</i> spp. (Murex Biotech. Ltd., UK) terhadap protein permukaan <i>Shigella flexneri</i> strain SF480	105
4.3 Ujian pencernaan protein 35 kDa dengan enzim tripsin	108
4.4 Pewarnaan asid periodik Schiff's (PAS)	110
5.1 Penentuan kehadiran antibodi IgA di dalam ampaian tinja jangkitan <i>Shigella flexneri</i> , tinja diareja jangkitan patogen lain dan tinja subjek normal	122
5.2 Penentuan kepekatan optimum protein SP untuk ujian titik-EIA	125
5.3 Penentuan kepekatan optimum protein 35 kDa untuk ujian titik-EIA	126
5.4 Penentuan pencairan optimum ampaian tinja (antibodi primer) untuk ujian titik-EIA	129
5.5 Tindakbalas ujian titik-EIA ke atas beberapa spesimen tinja diareja jangkitan patogen lain yang diketahui penyebabnya	131
5.6 Tindakbalas ujian titik-EIA ke atas beberapa spesimen tinja diareja yang dihantar ke makmal diagnostik	135

ABSTRAK

Shigella spesis adalah agen etiologi utama disenteri atau diarea berdarah pada manusia dan telah dikenalpasti sebagai penyebab penting morbiditi dan mortaliti pada kanak-kanak terutamanya di negara yang sedang membangun. Diagnosis awal shigelosis merupakan sasaran utama untuk menghadkan penyakit yang mudah ditularkan. Memandangkan kaedah rutin pengkulturan dan mengenalpastian *Shigella* spp. daripada tinja adalah sukar dan memerlukan proses ujikaji yang cerewet, memakan masa (3 hingga 5 hari), agak mahal dan mempunyai sensitiviti yang rendah, pembangunan ujian diagnostik segera yang ringkas perlu diwujudkan. Ujian tersebut perlulah sensitif, spesifik, mudah dilakukan, murah dan dapat mengesan kehadiran *Shigella* spp. terus di dalam spesimen pesakit terutamanya tinja. Sehubungan dengan itu, tujuan utama kajian ini adalah untuk mengenalpasti kehadiran protein yang antigenik dan spesifik bagi *Shigella* spp. untuk digunakan ke arah penghasilan ujian diagnostik segera bagi shigelosis.

Dengan menggunakan kaedah elektroforesis gel natrium dodesil sulfat-poliakrilamida (SDS-PAGE) dan imunoasai blot Western, satu protein permukaan yang antigenik dan juga spesifik berberat molekul 35 kDa telah dapat dikenalpasti. Protein tersebut juga didapati hadir pada kesemua *Shigella* spesis yang dikaji. Protein tersebut adalah spesifik terhadap antibodi kelas IgA tetapi tidak dengan IgM dan IgG serum serta ampaijan tinja jangkitan *Shigella flexneri*. Ia juga tidak bertindakbalas silang dengan beberapa serum serta ampaijan tinja diarea yang diakibatkan oleh jangkitan patogen lain yang lazim di

rantau ini atau daripada subjek normal manusia yang diuji. Sehingga kini, masih belum ada laporan berkaitan protein tersebut yang telah dikenalpasti.

Protein 35 kDa tersebut telah digunakan untuk membangunkan satu ujian diagnostik segera bagi shigelosis. Ujian titik-EIA telah dibangunkan untuk mengesan kehadiran antibodi kelas IgA terhadap jangkitan *Shigella* terus di dalam spesimen tinja pesakit dalam masa 3 jam. Berdasarkan keputusan yang diperolehi ujian titik-EIA didapati spesifik bagi *Shigella* spesis dan tidak bertindakbalas silang dengan tinja diarea jangkitan patogen lain yang diuji. Hasil ujian titik-EIA tersebut adalah positif apabila ditindakbalaskan dengan 3 tinja jangkitan *Shigella flexneri* (yang disahkan sebagai kultur positif untuk jangkitan *Shigella flexneri*) dan hasil negatif diperolehi apabila ditindakbalaskan dengan 129 spesimen tinja diarea yang penyebabnya tidak diketahui (yang disahkan sebagai kultur negatif bagi *Shigella* spp.).

DEMONSTRATION OF A SPECIFIC AND ANTIGENIC CELL SURFACE PROTEIN FOR *Shigella* spp. AND DEVELOPMENT TOWARDS A RAPID DIAGNOSTIC TEST FOR SHIGELLOSIS

ABSTRACT

Shigella spp. is the major etiologic agent of dysentery or bloody diarrhoea in humans. It has been identified as an important cause for morbidity and mortality among children especially in developing countries. Early diagnosis of shigellosis is the major strategy for limiting this highly contagious disease. Since routine culturing and bacterial determination from patients' faeces are laborious, time-consuming, relatively expensive and of low sensitivity, the development of a more rapid and simplified diagnostic test for shigellosis is highly desirable. The test must be sensitive, specific, easy to perform, cost-effective and be able to detect the presence of *Shigella* spp. directly from patients' specimen especially faeces. As such, the objective of this study was to determine the presence of a specific and antigenic protein for *Shigella* spp. and to use it for the development of a rapid diagnostic test for shigellosis.

By applying the techniques of sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blotting, a specific and antigenic protein with a molecular weight of 35 kDa was identified in all *Shigella* spp. tested. The protein was only specific to IgA but not IgM or IgG of patients' serum infected with *Shigella flexneri* as well as faecal specimens. The protein did not cross-react with sera or diarrhoeal faecal suspension of other

pathogenic infections common in this region nor with faecal specimens of normal subjects tested. To date, no previous report has been made regarding the protein.

The 35 kDa protein was used to develop a rapid diagnostic test for shigellosis. Dot-EIA test was developed to detect for the presence of specific IgA to *Shigella* infection directly in patients faecal specimens within 3 hours. The test was found to be specific for *Shigella* spp. and did not cross-react with any diarrhoeal faeces caused by other pathogens tested. The dot-EIA test was positive when reacted with 3 patients' faeces infected with *Shigella flexneri* (confirmed as culture positive for *Shigella flexneri*) and produced negative results when reacted with 129 diarrhoeal faecal specimens (culture negative for *Shigella* spp.).

BAB SATU

PENGENALAN

1.1 Sejarah dan kepentingan penemuan *Shigella*

Shigella adalah bakteria Gram negatif yang menjangkiti saluran usus manusia dan merupakan penyebab utama disenteri basilus atau lebih dikenali sebagai shigelosis (Blaser *et al.*, 1983; Lewis, 1992; Townes *et al.*, 1997; Ljungh, 1998). Disenteri basilus pertama kali dikenalpasti oleh Shiga pada tahun 1898 (ditinjau oleh Shears, 1996). Kajian lanjutan menunjukkan terdapat empat spesis yang terlibat dalam menyebabkan disenteri basilus iaitu *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* dan *Shigella sonnei* (Halpern *et al.*, 1989; Lewis, 1992; Ljungh, 1998).

Shigella merupakan salah satu agen penting yang menyebabkan banyak kematian akibat diarea di seluruh dunia terutamanya pada kanak-kanak (Stoll *et al.*, 1982). Dianggarkan terdapat lebih daripada 200 juta kes shigelosis dengan lebih kurang 650 000 kematian terjadi setiap tahun (ditinjau oleh Robin *et al.*, 1997). Pada sekitar tahun 1980an dianggarkan 250 juta orang di seluruh dunia telah dijangkiti penyakit shigelosis (Ljungh, 1998). Di Bangladesh, lebih kurang 12 000 pesakit atau 11.6% dijangkiti *Shigella* (Stoll *et al.*, 1982).

Mengikut pengelasan awal, *Shigella* spp. dikaitkan dengan *Escherichia coli*, oleh itu kedua-duanya digolongkan dalam satu kumpulan yang sama. *Shigella*

dan *Escherichia* digolongkan dalam famili Enterobacteriaceae dan mempunyai banyak persamaan daripada segi genetik (Brenner *et al.*, 1972; Taylor *et al.*, 1991). Penemuan strain *Escherichia* yang boleh menyebabkan penyakit menyerupai disenteri (Gross *et al.*, 1983) menyokong pendapat bahawa terdapat persamaan yang tinggi dalam susunan bes DNA di antara kedua-dua kumpulan tersebut. Tetapi kemudiannya, *Shigella* spp. dibezakan daripada *Escherichia coli* kerana ia merupakan penyebab primer disenteri basilus serius pada manusia, manakala pemencilan kebanyakan strain *Escherichia coli* daripada usus didapati tidak berbahaya (Ewing, 1986; Taylor *et al.*, 1991). Tambahan pula, *Shigella* dapat dibezakan daripada beberapa strain *Escherichia coli* kerana ia merupakan patogen yang mempunyai gen yang mengkodkan komponen yang membantu penembusannya ke dalam sel epitelium usus (Sansonetti, 1991; Taylor *et al.*, 1991). Kedua-duanya juga boleh dibezakan melalui beberapa ujian biokimia seperti ujian penapaian laktosa (Taylor *et al.*, 1986) dan dekarboksilat lisin (Rowe, 1990).

Shigella menjangkiti khususnya pada saluran gastrousus. Bakteria ini adalah patogenik hanya pada manusia dan jangkitan pada perumah haiwan masih belum dikenalpasti lagi. Penembusan ke dalam aliran darah dikatakan jarang berlaku dan dianggap sebagai kejadian terhad (Barret-Connor & Connor, 1970). Beberapa kes baru menunjukkan bahawa kejadian bakteremia yang diakibatkan oleh *Shigella* lebih kerap berlaku dan ini menyebabkan kadar kematian yang tinggi di kalangan kanak-kanak terutamanya yang malnutrisi (Duncan *et al.*, 1981).

Kepentingan dalam pengendalian jangkitan *Shigella* adalah sangat mustahak memandangkan kajian menunjukkan bahawa walaupun terdapat pengurusan yang baik di hospital, kadar mortaliti yang diakibatkan oleh disenteri melebihi 10 kali ganda berbanding kolera (Keusch & Bennish, 1989).

Di negara yang sedang membangun, diarea berdarah lebih dikaitkan dengan jangkitan *Shigella* yang merangkumi 50% daripada kes yang telah direkodkan, manakala kes yang selebihnya disebabkan oleh bakteria lain seperti *Escherichia coli* enteroinvasif (EIEC), *Salmonella* spp. atau *Campylobacter* (Ronsmans *et al.*, 1988).

1.2 Pengelasan *Shigella*

1.2.1 Pengelasan genus *Shigella*

Genus *Shigella* tergolong dalam famili Enterobacteriaceae. Genus *Escherichia* dan *Shigella* digolongkan dalam kelas Escherichiaea.

1.2.2 Pengelasan spesis *Shigella*

Secara umum, *Shigella* dibahagikan kepada empat spesis iaitu *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* dan *Shigella sonnei* berdasarkan ciri biokimia dan serologi (Ewing & Lindberg, 1984; Ewing, 1986). Pembahagian *Shigella* spp. kepada serotip masing-masing pula berdasarkan kehadiran antigen penentu yang spesifik pada rantai polisakarida O di lipopolisakarida (LPS) sampul sel masing-masing (Ewing, 1986).

1.2.2.1 Subkumpulan A

Ahli dalam kumpulan ini mempunyai ciri yang unik iaitu tidak berupaya untuk menapai manitol. Pada peringkat awal pengkelasan, ahli kumpulan ini terdiri daripada basilus Shiga, basilus Schmitz dan beberapa strain bakteria lain yang tidak begitu kerap dipencilkan. Tetapi pada masa kini, ahli kumpulan ini terdiri daripada serotip yang terdapat dalam spesis *Shigella dysenteriae*. Sehingga kini, terdapat 12 serotip yang telah dikenalpasti dan basilus Shiga telah dikenali sebagai *Shigella dysenteriae* serotip 1 manakala basilus Schmitz pula dikenali sebagai *Shigella dysenteriae* serotip 2 (Ewing & Lindberg, 1984).

1.2.2.2 Subkumpulan B

Ahli dalam kumpulan ini lebih mempunyai persamaan daripada segi antigen dan mempunyai keupayaan untuk menapai manitol. Pada masa sekarang, ia dikenali sebagai *Shigella flexneri* yang terdiri daripada 6 serotip (Ewing & Lindberg, 1984).

1.2.2.3 Subkumpulan C

Subkumpulan C telah ditemui oleh seorang saintis bernama Boyd dan digelar sempena namanya iaitu *Shigella boydii*. Ahli dalam kumpulan ini lebih mempunyai persamaan daripada segi ciri biokimia dengan *Shigella flexneri* tetapi berbeza dalam kandungan antigen (Gross *et al.*, 1980). Sehingga ini, terdapat 18 serotip yang telah dikenalpasti (Wathen-Grady *et al.*, 1985).

1.2.2.4 Subkumpulan D

Subkumpulan D telah dijumpai oleh Sonne pada tahun 1915 dan diberi nama *Shigella sonnei* (ditinjau oleh Rowe, 1990). Ianya terdiri daripada hanya 1 serotip sahaja. Ciri organisma ini agak berbeza dengan spesis yang lain iaitu ia merupakan penapai laktosa lambat di mana apabila dieramkan lebih daripada 24 jam, koloni merah jambu terhasil di atas agar MacConkey atau agar deoxycholate citrate (DCA).

1.3 Ciri fizikal dan biokimia

Shigella merupakan bakteria Gram negatif, berbentuk rod, bersaiz $2 \times 0.6 \mu\text{m}$ hingga $4 \times 0.6 \mu\text{m}$, tidak motil, tidak membentuk spora dan tidak mempunyai kapsul serta flagella (Sleigh, 1990). Fimbria (Jenis 1) hanya dijumpai pada *Shigella flexneri* tetapi tidak pada serotip 6 dan sesetengah strain dalam serotip lain (Sleigh, 1990). Secara makroskopik, di atas media umum, koloni bakteria ini tidak dapat dibezakan dengan koloni bakteria lain. Di atas agar MacConkey atau DCA ia menunjukkan ciri tidak menapai laktosa selepas dieramkan selama 18 hingga 24 jam. Kandungan G dan C di dalam DNA adalah di antara 50 hingga 52% (Rowe, 1990).

Shigella adalah bakteria yang sangat lemah dalam tinja manusia yang dikutip untuk kajian makmal. Ia hanya tahan selama beberapa jam dalam tinja yang dibiarkan menjadi berasid pada suhu bilik akibat pertumbuhan bakteria komensal, tetapi boleh hidup selama beberapa hari jika disimpan dalam

keadaan tak berasid iaitu apabila dicampurkan dengan larutan penampakan salin gliserol atau disimpan pada suhu 4°C ataupun -20°C (Wells & Morris, 1981; Rowe, 1990) Jika spesimen tidak boleh diproses dalam masa yang singkat, media pengangkut seharusnya digunakan. Penggunaan larutan penampakan salin gliserol didapati adalah lebih baik berbanding dengan media pengangkut Cary-Blair untuk tujuan pemencilan *Shigella* spp. (Wells & Morris, 1981). Kajian menunjukkan bahawa *S. sonnei* adalah lebih rintang terhadap alam sekitar berbanding spesis lain.

Organisma ini mudah mati, biasanya tahan selama 30 minit dalam tinja yang didedahkan pada keadaan sejuk, kering ataupun yang dibiarkan dalam bekas kutipan tinja (Baron *et al.*, 1994). Ia mudah mati dalam air berklorin, keadaan panas dan didedahkan pada bahan kimia (Baron *et al.*, 1994). *Shigella* dapat dibunuh dengan haba pada suhu 55°C selama satu jam, dalam 0.5% fenol selama 6 jam atau dalam 1% fenol selama 15 hingga 30 minit (Rowe, 1990).

1.4 Epidemiologi jangkitan *Shigella*

Keempat-empat spesis genus *Shigella* menyebabkan penyakit berspektrum luas iaitu daripada diarea berair kepada disenteri fulminan. Penyakit shigelosis yang paling serius adalah disebabkan oleh *Shigella dysenteriae* jenis 1. Strain *Shigella flexneri* pula kurang virulennya manakala *Shigella boydii* dan *Shigella sonnei* biasanya menyebabkan diarea febril berair yang terhad (Keusch & Bennish, 1989).

Shigelosis merupakan penyakit yang melanda seluruh dunia walaupun prevalensnya adalah berbeza mengikut kawasan. Ia biasanya dikaitkan dengan malnutrisi, kawasan yang kurang membangun, dilanda kemiskinan, mempunyai kesesakan penduduk dan tahap kebersihan yang rendah serta mempunyai kekurangan bekalan air (Keusch & Bennish, 1989; Lewis, 1992; WHO, 1999). *Shigella flexneri* dan *Shigella dysenteriae* lebih kerap dipencilkan di negara yang sedang membangun (Bennish & Wojtyniak, 1991). Jangkitan dengan *Shigella flexneri* dan *Shigella dysenteriae* lebih kerap terjadi di kawasan tropika dan di negara yang lebih miskin (Rowe, 1990) sehingga menyebabkan kadar kematian menjangkau 20% (Bennish & Wojtyniak, 1991). *Shigella sonnei* pula merupakan spesis yang utama dipencilkan di negara maju. Ia merangkumi sebanyak 70% daripada keseluruhan isolat yang diperolehi di Amerika Syarikat (Blaser *et al.*, 1983) dan lebih daripada 60% isolat yang dipencilkan di Jepun (Matsumoto *et al.*, 1998).

Shigelosis biasanya terjadi secara epidemik tetapi ia boleh juga terjadi secara endemik. Shigelosis endemik kerap terjadi pada kanak-kanak yang majoritinya berumur kurang daripada 10 tahun (Pal *et al.*, 1989). Kajian yang dilakukan di Peru menunjukkan majoriti pesakit yang mengalami shigelosis adalah kanak-kanak berumur kurang daripada 2 tahun (Minh *et al.*, 1998). Di negara tropika, infeksi endemik biasanya diakibatkan oleh *Shigella flexneri* dan merupakan penyakit yang sering terjadi pada kanak-kanak.

Terdapat perubahan yang besar daripada segi dominasi spesis *Shigella* di seluruh dunia dalam masa 80 tahun yang lepas (Keusch & Bennish, 1989).

Shigella dysenteriae wujud secara dominan sehingga perang dunia pertama tetapi selepas itu ia telah digantikan oleh *Shigella flexneri*. Selepas perang dunia kedua *Shigella sonnei* menggantikan *Shigella flexneri* di negara maju tetapi tiada perubahan dilihat di negara membangun. Di Thailand (Taylor *et al.*, 1991) dan Bangladesh (Ronsmans *et al.*, 1988), *Shigella* spp. dipencilkan daripada 50% kanak-kanak yang mengalami diarea berdarah. Taylor *et al.* (1986) mendapati bahawa 44% daripada kes disenteri di Thailand adalah disebabkan oleh *Shigella* spp. dan selebihnya disebabkan oleh *Campylobacter* spp. (16%), *Salmonella* spp. (10%), EIEC (5%) dan lain penyebab etiologi. Kadar kematian kanak-kanak yang dimasukkan ke hospital di Bangladesh akibat shigelosis adalah di antara 6% hingga 20% (Ronsmans *et al.*, 1988).

Di Malaysia, terdapat penurunan dalam bilangan disenteri (semua patogen penyebab) yang dilaporkan iaitu 955 kes pada tahun 1987 kepada 151 kes (1994), 152 kes (1995), 121 kes (1996) dan 132 kes (1997) (Kementerian Kesihatan Malaysia, 1997). Pada tahun 1997, purata kadar insidens disenteri di negara ini adalah 0.40 per 100 000 populasi. Walau bagaimanapun, sehingga kini, tiada laporan terperinci mengenai pemencilan setiap spesis *Shigella* di negara ini. Di Hospital Universiti Sains Malaysia, Kubang Kerian, Kelantan, 37 kes *Shigella* spp. telah dipencilkan pada tahun 1999 iaitu sebanyak 1.8% daripada jumlah spesimen tinja yang dihantar ke makmal diagnostik (komunikasi peribadi dengan Dr. Md. Radzi Johari). Sebahagian besar kes shigelosis tersebut adalah diakibatkan oleh *Shigella flexneri* iaitu 28 kes (75.6%) dan selebihnya diakibatkan oleh *Shigella sonnei* (24.3%). Tiada kes yang diakibatkan oleh *Shigella boydii* dan *Shigella dysenteriae* dilaporkan.

1.5 Penyebaran dan patogenisiti jangkitan *Shigella*

Perumah *Shigella* yang paling penting ialah manusia walaupun sesetengah mamalia peringkat tinggi boleh diinfeksi (Baron *et al.*, 1994). Kaedah penyebaran yang utama adalah secara langsung daripada individu ke individu (Wilson *et al.*, 1981) tetapi kaedah penyebaran secara tidak langsung boleh terjadi iaitu akibat pencemaran makanan, air dan lain-lain (Taylor *et al.*, 1991). Penyebaran *Shigella* dipermudahkan lagi kerana saiz inokulum yang rendah iaitu daripada beberapa ratus ke beberapa ribu mikroorganisma (DuPont *et al.*, 1989; Lewis, 1992; Gorden & Small, 1993). Kajian telah menunjukkan bahawa 10 hingga 100 bakteria *S. dysenteriae* boleh menyebabkan disenteri (Shears, 1996).

Bakteria ini didapati boleh tahan asid gaster dan asid hempedu (Lewis, 1992; Gorden & Small, 1993). Selepas memasuki perumah melalui makanan atau minuman yang tercemar, *Shigella* melepasi keadaan berasid di perut, melalui usus kecil dan melekat pada epitelium mukosa di bahagian hujung ileum dan kolon (Lewis, 1992). Keempat-empat spesis dalam genus *Shigella* menyebabkan sindrom disenteri yang mempunyai kebolehan unik untuk menembusi mukosa kolon manusia (LaBrec *et al.*, 1964; Takeuchi *et al.*, 1968). Proses penembusan dicirikan sebagai kemasukan bakteria ke dalam sel epitelium usus, pengandaan intrasel, penyebaran intrasel dan intersel serta kematian sel perumah (Anand *et al.*, 1986; Hale & Formal, 1987; Maurelli & Sansonetti, 1988).

Jangkitan sel ke sel dipermudahkan dengan merangsang sel perumah untuk membentuk filamen aktin bagi membolehkannya mencerooh sel epitelium usus yang berhampiran (Steinhauer *et al.*, 1999). Sel epitelium yang dijangkiti akan dimusnahkan akibat perencatan aktiviti respiratori sel. Sel perumah memberi tindakbalas inflamatori akut selepas 24 jam hingga 48 jam dijangkiti. Inflamasi dan pembebasan LPS akan menyebabkan nekrosis permukaan mukosa, ulser permukaan, pendarahan dan diarea. Patogenesis jangkitan *Shigella* yang ketara ialah pembentukan abses dan ulser pada mukosa kolon dan ini diikuti dengan proses infiltrasi leukosit polimorfonuklear yang banyak ke dalam lapisan mukosa di mana sel polimorfonuklear ini didapati membantu penembusan *Shigella flexneri* ke dalam sel epitelium usus (Strulens *et al.*, 1985; Islam *et al.*, 1997). Kajian oleh Renesto *et al.* (1996) menunjukkan strain *Shigella flexneri* yang invasif mengaktifkan sel polimorfonuklear secara langsung manakala strain yang tidak invasif kurang memberi kesan ke atas pengaktifan sel polimorfonuklear.

Penembusan ke dalam sel epitelium dikaitkan dengan protein membran luar (Outer Membrane Protein) yang spesifik yang dikodkan oleh plasmid DNA ekstrakromosom 220 kb (Hale *et al.*, 1985; Watanabe & Nakamura, 1986; Hale *et al.*, 1991). Protein yang terlibat dalam proses penembusan yang dirembeskan oleh plasmid ini akan dibincangkan dengan lebih terperinci di bahagian 1.10. Strain yang tidak mempunyai plasmid ini dikatakan tidak menunjukkan ciri virulen (Sansonetti *et al.*, 1982; Hale *et al.*, 1983). Komponen LPS yang terdapat pada dinding sel, termasuk rantai sisi polisakarida yang

spesifik kepada berlainan jenis antigen O juga merupakan salah satu faktor virulen bakteria ini (Lindberg *et al.*, 1991).

Satu lagi faktor yang terlibat dalam patogenesis adalah sitotoksin yang dihasilkan oleh kebanyakan spesis *Shigella* yang boleh mengakibatkan perembesan cecair (Keusch & Bennish, 1989). Ia dikenali sebagai toksin Shiga, sejenis protein berberat molekul 74 000 kilodalton (kDa) yang terdiri daripada dua subunit berbeza yang terikat secara tak kovalen (Donohue-Rolfe *et al.*, 1986).

Walaupun patogenisiti jangkitan *Shigella* yang utama adalah kebolehan menembusi dinding usus besar yang diikuti oleh reaksi inflamasi, kebanyakan strain juga menunjukkan penghasilan eksotoksin yang berkebolehan mengarahkan sel usus kecil untuk merembeskan air dan elektrolit dengan menggunakan mekanisme serupa dengan toksin *Vibrio cholerae* dan *Escherichia coli*. Semasa jangkitan akut, pesakit didapati mengeluarkan lebih kurang 10^6 hingga 10^{10} organisma per gram tinja (Rowe, 1990).

1.6 Gejala klinikal dan patologi jangkitan

Gejala klinikal akibat jangkitan *Shigella* tidak mempunyai perbezaan yang ketara berbanding gejala yang ditunjukkan oleh patogen penyebab diarea yang lain. *Shigella* spp. telah dikenalpasti sebagai salah satu patogen utama yang menyebabkan diarea berdarah pada manusia (Parker, 1990). Kerap kali gejala awal shigelosis adalah demam dan kolitis abdomen. Keadaan ini diikuti dengan

diarea. Diarea berair kerap terjadi pada kebanyakan pesakit tetapi sesetengah pesakit akan mengalami diarea berdarah yang lebih serius. Pesakit juga akan mengalami kekejangan abdomen, tenesmus dan kerap membuang tinja dalam kuantiti yang kecil. Dalam kebanyakan kes, gejala akan berlanjutan sehingga 10 hari atau lebih. Pada kebiasaannya, diarea akut akan terjadi selama beberapa jam hingga beberapa hari bergantung pada spesis bakteria yang menjangkiti (Keusch & Bennish, 1989).

Ciri tinja disenteri yang klasik biasanya adalah separuh terbentuk, bercampur dengan darah dan bermukus. Melalui pemeriksaan mikroskopik, kebanyakan tinja menunjukkan ciri eksudat inflamatori yang mengandungi sel leukosit dan sel darah merah (Speelman *et al.*, 1987).

Keseriusan jangkitan bergantung pada spesis yang menyebabkan jangkitan. Komplikasi jangkitan *Shigella* adalah seperti bakteremia, konvulsi, artritis reaktif dan sindrom hemolitik uremia. Jangkitan dengan *Shigella dysenteriae* biasanya dikaitkan dengan gejala yang lebih serius dan menyebabkan kanak-kanak mengalami konvulsi febril. Di negara membangun, kes bakteremia lebih dikaitkan dengan *Shigella dysenteriae* jenis 1 dan biasanya terjadi pada kanak-kanak (Strulens *et al.*, 1985). Proses inflamasi boleh berlarutan hingga ke lapisan sub-mukosa dan ini boleh menyebabkan terjadinya megakolon toksik atau berperforasi (Azad *et al.*, 1986). Selain daripada kerosakan kolon secara langsung, jangkitan biasanya dikaitkan dengan enteropati kehilangan protein yang kemudiannya mengakibatkan malnutrisi sekunder (Henry *et al.*, 1987).

Komplikasi utama akibatjangkitan *Shigella dysenteriae* jenis 1 adalah sindrom hemolitik uremia (HUS) yang merupakan penyebab utama mortaliti di hospital yang mempunyai kemudahan yang terhad (Koster *et al.*, 1978; Raghupathy *et al.*, 1978). Hiponatremia dan hipoglisemia boleh terjadi akibatjangkitan *Shigella dysenteriae* dan *Shigella flexneri*, dan hipoglisemia dikatakan menjadi faktor risiko mortaliti yang utama (Bennish *et al.*, 1990).

1.7 Rawatan

Shigelosis adalah salah satu daripada infeksi enterik yang jika dirawat dengan antibiotik yang betul akan memendekkan jangka waktujangkitan dan ia mungkin dapat mengurangkan kadar kematian (Haltalin, 1967). Jangkitan dengan *Shigella* spp. biasanya sembuh tanpa antibiotik. Oleh yang demikian, antibiotik hanya diberikan kepada pesakit yang dalam keadaan serius atau apabila terdapat tanda kemungkinan terjadi komplikasi yang memerlukan rawatan yang spesifik. Antibiotik yang biasa diberikan kepada pesakit adalah kombinasi trimethoprim-sulfamethoxazole, asid nalidiksik dan ciprofloksasin. Kajian yang dilakukan oleh Bennish *et al.* (1992) mendapati bahawa ciprofloksasin merupakan antibiotik yang paling berkesan untuk rawatanjangkitan ini. Azithromisin merupakan antibiotik baru yang masih dalam kajian untuk rawatan shigelosis (Khan *et al.*, 1997)

Kerintangan terhadap antimikrob, terutamanya di kalangan *Shigella dysenteriae* jenis 1 yang semakin meningkat merupakan masalah utama di kawasan tropika (Shears, 1993). Strain yang rintang terhadap kloramfenikol, tetrasiklin,

streptomisin, sulfonamida dan ampicilin telahpun dijumpai (Farrar & Eidson, 1971). Di Hospital USM, laporan kerintangan antibiotik ke atas 37 pencilan *Shigella* spp. bagi tahun 1999 adalah seperti berikut: tetrasiklin (65.7%), kotrimoksazol (55.6%), kloramfenikol (51.4%), ampicilin (50.1%), sefalekssin (40.0%) dan gentamisin (3.7%) (komunikasi peribadi dengan Dr. Md. Radzi Johari). Bagaimanapun, tiada kerintangan antibiotik dilaporkan untuk seftriakson, asid nalidiksik, pefloksasin dan sefotaksim pada tahun 1999. Kaedah penggantian cecair dan elektrolit merupakan rawatan yang paling berkesan bagi kes penghidratan di kalangan bayi.

1.8 Diagnosis makmal shigelosis

Ciri klinikal seperti diareja berdarah atau sindrom disentri yang lain serta terdapat banyak sel leukosit di dalam tinja diareja biasanya meramalkan kemungkinan pesakit menghidap penyakit shigelosis (Ronsmans *et al.*, 1988; Keush & Bennish, 1989).

Pemencilan *Shigella* daripada spesimen pesakit terutamanya tinja pesakit dengan menggunakan media selektif merupakan kaedah yang paling popular dan berkesan untuk mendiagnosis jangkitan patogen tersebut di kebanyakan makmal di seluruh dunia. Patogen yang telah dipencilkan akan dikenalpasti dengan ujian biokimia dan ujian penserotipan (Ewing, 1986; Farmer & Kelly, 1991).

Selain daripada itu, terdapat juga teknik baru dalam pengenalpastian jangkitan *Shigella* seperti prob DNA (Sethabutr *et al.*, 1985), tindakbalas rantai polimerase atau PCR (Frankel *et al.*, 1990; Islam & Lindberg, 1992) dan asai imunosorben untaian enzim atau ELISA (Lindberg *et al.*, 1984). Walaupun terdapat teknik baru yang lebih sensitif daripada kaedah pengkulturan, ia bukanlah kaedah rutin yang digunakan oleh kebanyakan makmal untuk mengesan shigelosis. Ini mungkin kerana kaedah tersebut memerlukan kos yang tinggi atau kemudahan alat yang canggih yang tidak terdapat di semua makmal.

1.8.1 Kaedah pengkulturan

Kaedah pengkulturan melibatkan proses pemencilan *Shigella* spp. di atas media selektif dan penentuan spesis ke atas koloni yang dipencilkan.

1.8.1.1 Penggunaan media selektif

Spesimen klinikal yang kerap digunakan adalah tinja ataupun swab rektum. Media pengangkut yang sesuai seharusnya digunakan sekiranya spesimen klinikal ini tidak boleh diproses dalam masa beberapa jam kerana *Shigella* hanya hidup di dalam tinja untuk jangkamasa yang pendek (Shears, 1996). Agar nutrien dan agar darah adalah media yang boleh digunakan untuk pertumbuhan *Shigella*. Di atas agar ini, ia membentuk koloni licin, tidak berwarna atau berwarna kelabu, lutcahaya dan berdiameter 2 hingga 3 mm.

Koloni *S. sonnei* pula adalah lebih besar sedikit dan lebih legap berbanding koloni spesies *Shigella* yang lain.

Media selektif yang boleh digunakan untuk tujuan pemencilan *Shigella* adalah seperti agar MacConkey, agar xylose lysine deoxycholate (XLD) dan agar deoxycholate citrate (DCA). Di atas agar MacConkey, koloni yang terbentuk tidak menapai laktosa dan kelihatan pucat dan kekuningan. *Shigella sonnei* merupakan organisma penapai laktosa lambat, dengan itu koloni yang terbentuk akan berubah menjadi merah muda jika dieramkan lebih daripada 24 jam. DCA merupakan media selektif yang amat baik untuk pemencilan *Shigella* daripada tinja. Koloni yang terbentuk adalah pucat, kecil (1 hingga 1.5 mm diameter) dan lebih lutcahaya daripada *Salmonella*. Agar XLD merupakan media selektif terbaik untuk pemencilan *Shigella* dan ia kurang merencat pertumbuhan *Shigella dysenteriae* dan *Shigella flexneri* jika dibandingkan dengan agar DCA (Sleigh, 1990).

Air pepton dan kaldu nutrien menghasilkan pertumbuhan yang baik jika dieramkan semalaman pada 37°C. Kaldu Selenite F adalah medium diperkaya bagi *Shigella sonnei* dan *Shigella flexneri* serotip 6, tetapi merencat pertumbuhan *Shigella* yang lain (Sleigh, 1990). Suhu pertumbuhan yang optimum adalah 37°C tetapi *Shigella sonnei* boleh hidup pada suhu 10°C hingga 45°C.

1.8.1.2 Pengenalpastian spesies *Shigella*

Setelah spesimen tinja dikultur di atas media selektif, pengamatan morfologi, ujian biokimia dan serologi akan dilakukan ke atas koloni bakteria yang dipencilkan. Ujian biokimia dilakukan ke atas koloni yang dipencilkan untuk mengetahui genus bakteria tersebut. Koloni dikultur di atas dua media biokimia iaitu Kligler-iron agar (KIA) dan motiliti-indol-urea (MIU) (WHO, 1987).

Pengenalpastian spesies dan serotip isolat *Shigella* dilakukan dengan menggunakan ujian aglutinasi slaid yang melibatkan antiserum *Shigella* yang spesifik terhadap antigen somatik (antigen O) masing-masing (Kauffmann, 1969; Ewing 1986). Sehingga kini, kebanyakan makmal diagnostik menggunakan 4 jenis antiserum polivalen untuk mengenalpasti spesies *Shigella* (*Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei* dan *Shigella boydii*). Kaedah penghasilan antiserum polivalen untuk *Shigella* spp. adalah sama seperti yang digunakan untuk menghasilkan antiserum polivalen O bagi *Escherichia coli* dan *Salmonella*. Sejak kebelakangan ini, antiserum polivalen O diperolehi apabila sel keseluruhan dididihkan dan digunakan untuk imunisasi. Antiserum polivalen O yang dihasilkan bagi mengenalpasti setiap spesies adalah terhadap antigen ahli kumpulan dalam spesies masing-masing. Contohnya antiserum polivalen subkumpulan A dihasilkan terhadap antigen O kesemua ahli kumpulan dalam *Shigella dysenteriae*. Selain daripada itu, pengenalpastian serotip turut dilakukan dengan menggunakan antiserum terhadap antigen spesifik atau antigen somatik major yang khas bagi serotip masing-masing.

Penentuan kumpulan O adalah kaedah serologi yang dominan memandangkan tiada strain yang motil wujud dan tiada antigen khusus yang telah dikenalpasti.

Antiserum yang boleh didapati secara komersil untuk penserotipan *Shigella* adalah sangat mahal dan keputusan yang diperolehi dengan menggunakan antisera ini tidak mempunyai ketepatan 100%. Keputusan yang tidak tepat biasanya diperolehi dengan *Shigella flexneri* (Evins *et al.*, 1988). Ujian serotip dengan menggunakan antibodi monoklon memberi keputusan yang lebih memuaskan tetapi reagen ini tidak boleh diperolehi secara komersil (Carlin & Lindberg, 1983; Carlin & Lindberg, 1986).

1.8.2 Kaedah lain untuk pengesanan *Shigella*

Kaedah biasa untuk pengesanan *Shigella* iaitu pengkulturan di atas media selektif dan pengenalpastian organisma secara ujian biokimia dan serologi memakan masa yang panjang, memerlukan media yang mahal dan pekerja yang mahir untuk mengenalpasti organisma tersebut.

Pemeriksaan mikroskopik ke atas sampel tinja untuk sel leukosit telah digunakan untuk membezakan disenteri basilus dan disenteri amebik. Di Bangladesh, 85% daripada pesakit shigelosis mempunyai lebih daripada 50 sel leukosit '*per high power field*' berbanding dengan hanya 28% daripada pesakit disenteri amebik (Speelman *et al.*, 1987). Di Thailand, pemeriksaaan sel leukosit di dalam tinja didapati sangat berguna untuk membezakan jangkitan *Shigella* daripada *Escherichia coli* enterotoksigenik (ETEC), rotavirus,

Campylobacter, *Escherichia coli* enteropatogenik (EPEC), EIEC dan *Salmonella* spp. (Speelman *et al.*, 1987; Echeverria *et al.*, 1991).

Kaedah lain yang digunakan untuk mengesan jangkitan *Shigella* ialah dengan mengesan bakteria *Shigella* atau antigen yang dikaitkan dengannya secara langsung dalam sampel tinja. Kaedah ini telah berjaya digunakan dalam pengesanan *Salmonella* dengan menggunakan teknik ELISA (Robinson *et al.*, 1983). Ujian Widal dengan menggunakan organisma hidup telah digunakan untuk mengesan jangkitan *Shigella flexneri* (Verbrugh *et al.*, 1987).

Terdapat banyak kajian yang telah dilakukan untuk menunjukkan bahawa pesakit yang dijangkiti *Shigella* menghasilkan tindakbalas imun terhadap patogen tersebut (Hale *et al.*, 1985; Oaks *et al.*, 1986; Buysse *et al.*, 1987). Kajian oleh Cohen *et al.* (1991) menunjukkan bahawa jangkitan dengan *Shigella* menghasilkan pertahanan serotip-spesifik terhadap jangkitan semula patogen tersebut. Tindakbalas imun menunjukkan peningkatan antibodi kelas IgG, IgM dan IgA terhadap LPS *Shigella*.

Kehadiran antibodi anti-*Shigella* di dalam serum pesakit menjadi parameter utama ujian serologi. Ini mewujudkan pelbagai teknik baru dalam pengesanan jangkitan *Shigella* spp. seperti pengaglutinan (Metzler & Nachamkin, 1988), ELISA (Pal *et al.*, 1985) dan dot-ELISA (Suthienkul *et al.*, 1993). Caceres dan Mata (1974) mengukur tahap tindakbalas serologi pesakit yang mengalami shigelosis dengan menggunakan kaedah hemaglutinasi pasif yang

menggunakan polisakarida dinding sel daripada beberapa spesis *Shigella*. Berdasarkan kajian tersebut, titer antibodi maksimum dicapai dalam masa 8 hingga 10 hari dan aras antibodi menjadi tidak signifikan selepas 5 hingga 6 bulan. Ujian hemaglutinasi tak langsung telah dibangunkan dengan menggunakan sel darah merah yang ditindakkan dengan ampai kultur *Shigella* atau komponen LPS separa tulen (Patton *et al.*, 1976). Ujian ini didapati sensitif dalam pengesanan antibodi terhadap *Shigella*. Akan tetapi spesifisiti ujian tersebut agak terhad kerana tindakbalas silang didapati berlaku di antara *Shigella* dan *Escherichia coli*.

Teknik ELISA mempunyai kelebihan untuk mengesan kelas imunoglobulin secara berasingan. Keren (1979) telah membangunkan teknik ELISA untuk pengesanan antibodi spesifik terhadap antigen LPS *Shigella flexneri*. Asai tersebut digunakan untuk mengesan kehadiran antibodi IgA dan IgG di dalam serum dan rembesan usus. Pada masa ini, beberapa kaedah telah dicipta untuk mengesan kehadiran penanda virulen yang terdapat pada *Shigella* spp. dan EIEC. Pal *et al.* (1983) telah menunjukkan komponen antigenik iaitu antigen penanda virulen pada semua strain virulen *Shigella* dan EIEC dengan menggunakan kaedah asai imunoenzim (EIA). Antigen penanda virulen tersebut dikodkan oleh plasmid invasif yang dikaitkan dengan kevirulenan *Shigella*. Ia dikenali sebagai antigen plasmid invasif (ipa) iaitu ipaC. Oleh kerana protein yang dikodkan oleh plasmid invasif terdapat pada semua strain *Shigella* dan EIEC, pengesanan-imuno (immunodetection) antigen ini boleh digunakan untuk mengenalpasti patogen tersebut. Dengan demikian, penyelidik tersebut telah membangunkan teknik ELISA yang boleh membezakan strain

virulen dan tidak virulen *Shigella* spp., EIEC dan bukan EIEC dalam masa 24 jam. Pengubahsuaian telah dilakukan ke atas asai tersebut yang melibatkan penggunaan serum yang telah dijerapkan dengan strain tak-virulen (Pal *et al.*, 1985). Serum tersebut mengandungi antibodi spesifik terhadap antigen penanda virulen yang hanya terdapat pada strain yang virulen. Pembangunan asai ini didapati sesuai untuk kajian epidemiologi yang memerlukan pemeriksaan jumlah sampel yang banyak. Kaedah ELISA dengan menggunakan antibodi monoklon terhadap antigen ipaC telah dibangunkan dan digunakan untuk mengesan strain *Shigella* dan EIEC (Pal *et al.*, 1997).

Lindberg *et al.* (1984), telah membangunkan kaedah ELISA untuk pengesanan jangkitan *Shigella dysenteriae* jenis 1. Kaedah ini menggunakan antigen LPS bakteria tersebut untuk mengesan kehadiran antibodi spesifik di dalam serum. Mereka mendapati peningkatan aras IgA di dalam serum yang dikutip pada 10, 30 dan 45 hari selepas pesakit menghadapi jangkitan. Aras titer IgG juga meningkat secara signifikan selepas 30, 45 dan 180 hari dijangkiti. Secara keseluruhan hasil kajian mendapati terdapat peningkatan yang signifikan pada titer IgA, IgM dan IgG di dalam sampel yang dikutip selepas 10, 30, 45 dan 180 hari jangkitan.

Dengan menggunakan ujian dot-ELISA, Suthienkul *et al.* (1993) telah membuat kajian seroepidemiologi untuk mengesan kehadiran antibodi terhadap LPS *Shigella flexneri* bagi mengetahui pendedahan terhadap organisma tersebut. Folderus *et al.* (1995) telah membangunkan EIA dengan menggunakan antibodi monoklon terhadap protein 43 kDa (ipaC). Asai ini didapati boleh membezakan

strain *Shigella* dan EIEC yang virulen dan tidak virulen. Pembangunan kaedah ELISA dengan menggunakan toksin Shiga telah dilakukan oleh Kongmuang *et al.* (1987). Kaedah ini didapati berguna untuk mengesan toksin Shiga dan toksin yang menyerupai Shiga yang dihasilkan akibat jangkitan *Shigella dysenteriae* dan *Escherichia coli*. Teknik ELISA terbaru yang menggunakan protein ipaD (38 kDa) telah dikaji oleh Oaks *et al.* (1996). IpaD ELISA tersebut didapati mempunyai korelasi yang tinggi dengan teknik ELISA yang dihasilkan sebelum ini serta mempunyai beberapa kebaikan lain. Antara kebajikannya ialah penggunaan antigen yang kurang, penghasilan kesan latar belakang yang lebih rendah serta tidak memerlukan penggunaan antigen daripada organisma tak-virulen.

Satu kaedah yang sensitif dan cepat untuk pengesanan *Shigella dysenteriae* jenis 1 dan *Shigella flexneri* dalam tinja berdasarkan kepada perangkapan (capture) organisma tersebut dengan partikel imunomagnetik telah dilakukan oleh Islam *et al.* (1993). Partikel disalut dengan antibodi monoklon yang spesifik terhadap antigen O. Organisma yang terlekat pada partikel tersebut dikesan dengan EIA yang menggunakan antiserum spesifik terhadap antigen O tersebut. Tempoh masa yang diperlukan untuk melakukan ujian ini adalah 2 hingga 3 jam dan sensitiviti ujian adalah 10^3 cfu/ml tinja.

Prob DNA juga telah digunakan sebagai kaedah diagnosis alternatif dalam pengesanan jangkitan *Shigella*. Pada mulanya kajian lebih ditumpukan kepada penggunaan prob DNA untuk diagnosis *Shigella* dan EIEC terus daripada sampel tinja pesakit, iaitu dengan mengesan kehadiran plasmid besar (~ 200

kbp) yang hanya terdapat pada organisma yang virulen sahaja (Hale *et al.*, 1983). Prob yang telah dihasilkan adalah fragmen terhad 17-kb EcoR1 (Boileau *et al.*, 1984; Taylor *et al.*, 1986) dan prob oligonukleotida daripada fragmen terhad 2.5-kb HindIII (Frankel *et al.*, 1990). Selain daripada itu, prob spesifik plasmid virulen yang mengesan gen ipaB, ipaC dan ipaD yang mengkodkan protein yang berkaitan dengan penembusan organisma telah digunakan dalam pengesanan koloni *Shigella* dan EIEC dengan menggunakan kaedah hibridasi *in situ* (Venkatesan *et al.*, 1988). Hartman *et al.* (1990) telah membangunkan prob gen ipaH yang didapati lebih stabil daripada prob yang telah dihasilkan sebelum ini. Gen ipaH tersebut dijumpai pada kromosom dan plasmid invasif yang mengekodkan protein 60 kDa. Kajian yang telah dilakukan dengan menggunakan prob tersebut mendapati ia adalah sangat sensitif dan spesifik untuk mengesan jangkitan dengan *Shigella* dan EIEC (Venkatesan *et al.*, 1989). Oberhelman *et al.* (1993) telah memperkembangkan penggunaan prob ipaH yang dilabel dengan alkalin fosfatase bagi pengesanan shigelosis.

Sistem diagnosis yang berkaitan dengan amplifikasi DNA atau PCR telah dibangunkan untuk meningkatkan sensitiviti pengesanan *Shigella*. Dengan menggunakan kaedah PCR, Frankel *et al.* (1990) telah mengenalpasti jujukan nukleotida yang spesifik yang terdapat di lokus "*ial*" iaitu lokus yang dikaitkan dengan penembusan *Shigella* ke dalam sel epitelium usus. Selain daripada itu, amplifikasi jujukan nukleotida yang mengkodkan antigen ipaH juga telah dibangunkan untuk tujuan diagnosis shigelosis (Sethabutr *et al.*, 1993). Gaudio *et al.* (1997) telah menggunakan sistem diagnosis PCR tersebut untuk kajian epidemiologi yang berkaitan dengan shigelosis.

Islam & Lindberg (1992) pula telah menggunakan kombinasi kaedah pemisahan imunomagnetik dan PCR untuk pemencilan dan pengenalpastian *Shigella dysenteriae* jenis 1 dan *Shigella flexneri* secara langsung daripada tinja pesakit. Kaedah ini terdiri daripada dua langkah iaitu pemencilan bakteria daripada tinja dengan menggunakan butiran imunomagnetik yang disalut dengan antibodi monoklon yang spesifik terhadap polisakarida O organisma tersebut. Seterusnya, jujukan nukleotida yang spesifik iaitu pada lokus "*ia*" diamplifikasi dengan teknik PCR dan dikesan dengan menggunakan kaedah hibridasi dot blot. Kaedah ini mengambil masa 6 hingga 7 jam dan sensitiviti ujian ini adalah 10 bakteria per gram tinja.

1.9 Kajian berkaitan protein *Shigella*

Organisma Gram negatif yang patogenik mempunyai membran luar yang bertindak sebagai interfasa di antara patogen dan perumah dan memainkan peranan penting di dalam perhubungan perumah-parasit (DiRienzo *et al.*, 1978). Kajian yang telah dilakukan ke atas beberapa patogen menunjukkan bahawa komponen yang terdapat pada membran permukaan membolehkan pelekatan patogen tersebut pada sel perumah, bertindak menyerang sel perumah, memberikan ciri kerintangan terhadap aktiviti bakterisid serum dan menghalang proses fagositosis (DiRienzo *et al.*, 1978; Lambden *et al.*, 1979; Kay *et al.*, 1981). Protein membran luar merupakan antigen terawal yang merangsang tindakbalas imun. Oleh yang demikian, komponen tersebut adalah sesuai untuk tujuan penghasilan ujian diagnosis segera.